Aus der Universitäts-Frauenklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. Schwalm

IMMUNCHEMISCHE UND HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN DER FASERTYPEN AUS QUERGESTREIFTER MUSKULATUR

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Karla Maria Meschede
aus Berlin

Würzburg 1970

Aus der Universitäts-Frauenklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. Schwalm

IMMUNCHEMISCHE UND HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN DER FASERTYPEN AUS QUERGESTREIFTER MUSKULATUR

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Karla Maria Meschede
aus Berlin

Würzburg 1970

Referent: Priv.Doz. Dr. Ute S t e w a r t
Korreferent: Prof. Dr. T. H. S c h i e b l e r

Tag der Promotion:

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Ziel der Arbeit	2
Methoden und Substanzen	3
A. Darstellung des kontraktilen Proteins (Aktomyosin)	3
B. Immunologische Methoden	3
I. Gewinnung der Antiseren	4
II. Darstellung der Gamma-Globulin-Fraktion	4
III. Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion durch Immundiffusion	4
IV. Darstellung der FITC-konjugierten Antikörper	4
V. Absorption der konjugierten Gamma-Globulin-Fraktionen	5
C. Immunchemische und histochemische Untersuchungen der Muskeln	5
I. Vorbereitung der Gewebe	5
II. Färbung der Gewebe mit FITC-anti-PAM-γ-G nach der "direkten" Methode	5
III. Nachweis der NADH-Diaphorase	6
IV. Bestimmung der ATPase-Aktivität	6
D. Substanzen	7
Ergebnisse der Untersuchungen	8
A. Antikörper gegen PAM, ihre Organ- und Artspezifität	8
B. Ergebnisse der Untersuchungen an Gewebeschnitten	10
I. Darstellung der quergestreiften Muskelfasern nach Einwirkung von FITC-anti-PAM-γ-G	10
II. Darstellung der Fasern aufgrund ihrer Reduktase-Aktivität am Beispiel der NADH-Diaphorase	19
III. Darstellung der Fasern aufgrund ihrer Myosin-ATPase-Aktivität	20
Besprechung der Ergebnisse	21
Zusammenfassung	25
Literaturverzeichnis	26

LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
NADH	reduziertes Nikotinamid-adenin-dinukleotid
Nitro BT	Nitro Blue Tetrazolium
PAM	Aktomyosin aus menschlichem M. pectoralis maior
PM	Myosin aus menschlichem M. pectoralis maior
P-HMM	H-Meromyosin aus menschlichem M. pectoralis maior
P-LMM Fr_1	L-Meromyosin Fraktion 1 aus menschlichem M. pectoralis maior
P-Aktin	Aktin aus menschlichem M. pectoralis maior
anti-PAM	Kaninchen Antiserum gegen menschliches Pectoralisaktomyosin
anti-PAM-γ-G	Gamma-Globulin-Fraktion dieses Antiserums
FITC-anti-PAM-γ-G	mit Fluoresceinisothiocyanat markiertes Gamma-Globulin
UAM	Aktomyosin aus menschlichem Uterusmuskel
anti-UAM	Kaninchen Antiserum gegen menschliches Uterusaktomyosin
FITC-anti-UAM-γ-G	mit Fluoresceinisothiocyanat markiertes Gamma-Globulin dieses Antiserums
FITC-NIS-γ-G	mit Fluoresceinisothiocyanat markiertes Gamma-Globulin von Nichtimmunseren

EINLEITUNG

Aufgrund der Untersuchungen von WACHSTEIN und MEISEL (1), DUBOWITZ und PEARSE (2, 3), DUBOWITZ (4) und LOCKER und HAGYARD (5) wird heute allgemein angenommen, daß sich Muskelfasern von Menschen und Tieren aus mindestens zwei Fasertypen zusammensetzen, die man als Typ I und Typ II bezeichnet. Fasern des Typs I weisen einen hohen Gehalt oxidativer Enzyme, die für den aeroben Stoffwechsel bestimmend sind, auf. Demgegenüber enthalten Typ II Fasern nur wenig oxidative, dafür aber reichlich glykolytische Enzyme, die den anaeroben Stoffwechsel bestimmen. Weiterhin unterscheiden sich die beiden Fasertypen in ihrer Myosin-ATPase-Aktivität: in den Typ I Fasern ist sie relativ niedrig, in denen des Typs II hoch. Im allgemeinen bezeichnet man Muskeln mit Fasern des Typs I als "rote" und solche mit Fasern des Typs II als "weiße"; finden sich in einem Muskel beide Fasertypen nebeneinander, so werden sie als "gemischt" bezeichnet. Nach ENGEL (6, 7), OGATA (8), PADUKULA und GAUTHIER (9) können von den beiden Extremtypen I und II noch Intermediärformen abgegrenzt werden.

Auch biochemische Untersuchungen (10, 11, 12, 13, 14) weisen darauf hin, daß die Myosinfraktion der isolierten kontraktilen Proteine der beiden Fasertypen von unterschiedlicher Struktur ist. Danach sollen sich die multiplen Myosinformen nicht so sehr in Molekülgröße und -form unterscheiden, sondern, in Übereinstimmung mit den histochemischen Befunden, in ihrer enzymatischen Aktivität (ATPase höher in "weißen", niedriger in "roten" Muskelfasern), ferner in der Geschwindigkeit der Superpräzipitation der Aktomyosingele ("rote" kontrahieren langsamer als "weiße") und in ihrer Trypsinempfindlichkeit ("weiße" sind trypsinempfindlicher als "rote"). Die Primärstruktur soll dagegen kaum Unterschiede aufweisen (WU, 15).

Überraschenderweise zeigte es sich, daß Antiseren, die in Kaninchen gegen gereinigtes Aktomyosin aus menschlichem

Pectoralis Muskel erzeugt wurden, bevorzugt speziesunspezifisch mit dem Aktomyosin "roter" Muskeln reagierten und im Gewebeschnitt bei Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper die Muskelfasern mit unterschiedlicher Intensität anfärbten (16, 17).

ZIEL DER VORLIEGENDEN ARBEIT

war es daher, an serienmäßigen Gefrierschnitten von Menschen- und Kaninchenmuskeln zu untersuchen, wie sich die verschiedenen Fasertypen mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper (FITC-anti-PAM-γ-G) im Vergleich zum Nachweis eines oxidativen Enzyms (NADH-Diaphorase) und der myofibrillären Adenosintriphosphatase verhielten.

METHODEN UND SUBSTANZEN

A. Darstellung der kontraktilen Proteine (Aktomyosin)

Die bei radikalen Mammaamputationen entfernten Mm. pectoralis maior und minor werden im Fleischwolf zerkleinert und 24 Stunden bei 4°C mit dem dreifachen Volumen WEBER-EDSALL Lösung (0,6 M KCl; 0,01 M Na_2CO_3; 0,04 M $NaHCO_3$; pH 8,2) gerührt. Der Extrakt wird filtriert, Aktomyosin fällt aus dem Filtrat nach Verdünnen mit dem 5fachen Volumen eiskalten Wassers aus und wird abzentrifugiert. Das Gel wird solange mit Wasser gewaschen und zentrifugiert, bis der Überstand frei von Häm-Verbindungen ist. Nach Lösen in 0,6 M KCl wird Aktomyosin durch einstündiges Zentrifugieren bei 100 000 x g in Gegenwart von 10^{-3} Natriumpyrophosphat, pH 7,0 von aggregiertem Protein und partikulären Verunreinigungen befreit (18). Zwei Umfällungen bei Ionenstärken von μ = 0,1 und μ = 0,25 folgen. Aktomyosin wird in 0,6 M KCl gelöst und nach Zusatz des gleichen Volumens Glycerin bei -20°C aufbewahrt (19). Vor der weiteren Verwendung wird das Glycerin durch zweimaliges Umfällen oder durch Dialyse entfernt.

B. Immunologische Methoden

I. Gewinnung der Antiseren

Die Primärimmunisierung erfolgt durch Injektion von 5-10 mg Aktomyosingel aus Pectoralis Muskel gemischt mit 0,5 ml FREUND's Adjuvans und 1 mg abgetöteter Tuberkelbakterien (Difco Laboratories, Detroit Michigan USA) beiderseits in die Popliteallymphknoten von Kaninchen. Die weitere Immunisierung geschieht durch intravenöse Injektion der Proteingele in die laterale Ohrvene nach etwa 30 Tagen. Im Abstand von zwei Tagen werden dreimal 10 mg Aktomyosin in 2-3 ml 0,155 M NaCl verabreicht. Nach einer Pause von erneut 30 Tagen wird dieses Schema noch einmal wiederholt, sodaß jedes Tier insgesamt 60-70 mg des kontraktilen Proteins erhält. 10 Tage nach der

letzten Injektion werden die Kaninchen aus der Arteria carotis externa entblutet. Die Immunseren werden bei -20° C ohne Zusatz von Konservierungsmitteln aufbewahrt.

II. Darstellung der Gamma-Globulin-Fraktion
aus den Immunseren und Präimmunisierungsseren erfolgt durch dreimalige Ammoniumsulfatfällung nach (20).

III. Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion durch Immundiffusion
Auf einen Objektträger werden 2,5 ml einer warmen 1%igen Lösung von Reinagar (Difco Nobel) in 0,6 M KCl - 0,02 M Tris - HCl Puffer, pH 7,4 unter Zusatz von 0,01% Cialit^{R} aufgetragen. Die Antigenlöcher (Durchmesser 4 mm) sind untereinander und von der Antiserumrinne 5 mm entfernt. Das Antiserum wird unverdünnt verwendet, die Antigene in einer Konzentration von 1-2 mg/ml. Die Entwicklung der Fällungszonen erfolgt bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer über 1-6 Tage. Nach Beendigung der Reaktion werden die Plättchen mit 0,6 M KCl und Wasser gewaschen, getrocknet und gefärbt.

IV. Darstellung der FITC-konjugierten Antikörper (21, 22)
Die nach B. 1 und 2 hergestellten Gamma-Globulin-Fraktionen (10 mg/ml) werden mit einem Zehntel ihres Volumens an 0,5 M Natriumbicarbonat/-carbonat Puffer, pH 9 versetzt. Pro mg Gamma-Globulin werden 0,02 mg Fluoresceinisothiocyanat zugefügt und das Gemisch 16 Stunden bei 4° C gerührt. Nicht gebundener Farbstoff wird zunächst durch Dialyse gegen phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4, dann durch Filtration an einer Sephadex G-25 Säule (20 x 2 cm ist ausreichend für die meistens eingesetzte Menge von 50 mg), die mit dem gleichen Puffer äquilibriert ist, entfernt. Eiweißgehalt und das FITC/Protein Verhältnis werden nach einem Nomogramm in (23) bestimmt. Das Farbstoff/Eiweiß Verhältnis beträgt im allgemeinen zwischen 3 und 5.

V. Absorption der konjugierten Gamma-Globulin-Fraktionen
Vor der Verwendung werden die Konjugate der Antikörper gegen Pectoralisaktomyosin und die Präimmunisationskontrollseren an Pectoralishomogenat absorbiert. Die Trockenpulver werden zuvor mit wenigen Tropfen Puffer angefeuchtet, um einen Verlust an Konjugat weitestgehend zu vermeiden.

C. Immunchemische und histochemische Untersuchungen der Muskeln

I. Vorbereitung der Gewebe
Die Kaninchen werden durch Ausbluten getötet und die Mm. biceps brachii, triceps brachii (caput mediale), psoas maior, iliacus, longissimus dorsi, glutaeus medius, glutaeus minimus, vastus lateralis, semitendinosus, tibialis anterior, gastrocnemius (caput mediale), plantaris, soleus, das Diaphragma und das Herz entnommen. Etwa 0,5 cm^3 große Würfel von ihnen werden mit festem Kohlendioxid bei -50°C so eingefroren, daß die Schnittrichtung quer zur Faserrichtung verläuft. Die Dicke der Kryostatschnitte (Pearse-Slee-Kryostat) beträgt 4-6 für die immunchemischen und 10 für die histochemischen Untersuchungen. Sie werden auf Objektträger aufgezogen und im allgemeinen ohne Fixierung 1-2 Stunden im Kaltluftstrom getrocknet. Rein "weiße" Muskeln werden 10 Min. in phosphatgepuffertem Formalin, pH 7,2-7,4, fixiert.

II. Färbung der Gewebe mit FITC-anti-PAM- -G nach der "direkten" Methode (24)
Die Kryostatschnitte werden mit einem Tropfen COONS-Puffer (0,01 M Na-barbiturat; 0,144 M NaCl, mit HCl auf pH 7,2 einstellen) angefeuchtet und mit einem Tropfen des Konjugates (in einer Konzentration von 1-2 mg/ml) bedeckt. Man läßt die Schnitte 30 Min. in einer feuchten Kammer stehen, spült sie vorsichtig ab und wäscht sie 90 Min. lang mit mehrfach gewechseltem COONS-Puffer. Die Objektträger werden unter Aussparung des Schnittes abgetrocknet und mit einem Gemisch von 30% 0,1 M Glycin Puffer und 70% Glycerin eingebettet.

Alle Präparate werden sofort im LEITZ ORTHOLUX Fluoreszenz-Mikroskop unter Verwendung eines Blau-Violett-Filters betrachtet und zur Dokumentation mit High Speed Ektachrom Diapositiv Film (Day Light) fotografiert. Der Kamera (automatische Belichtungszeiteinstellung) wird ein Gelbfilter vorgeschaltet. Die Vergrößerung der Originalaufnahmen war 100fach.

III. Nachweis der NADH-Diaphorase
erfolgt nach (25).
Die Inkubationslösung enthält:

0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,2-7,4	1,0 ml
Ringerlösung	0,7 ml
Nitro BT (5 mg/ml)	0,3 ml
NADH (6 mg/ml)	1,0 ml

Die Schnitte werden 30 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach mehrfachem Spülen mit aqua dest. werden sie anschließend durch Isopropanol (zweimal, insgesamt 4 Min.) und Xylol (zweimal, insgesamt 10 Min.) geführt und mit Entellan (Merck Darmstadt) eingebettet. Zellorte mit starker Reduktase-Aktivität (Mitochondrien) zeichnen sich durch Bildung der Formazane aus Nitro BT aus und sind blauviolett angefärbt.

IV. Bestimmung der ATPase-Aktivität
wird durchgeführt nach einer Modifikation der Methode von PADYKULA und HERMAN (26).
Die Inkubationslösung enthält:

0,1 M Na-barbital	1,0 ml
0,18 M $CaCl_2$	0,5 ml
0,014 M ATP	1,0 ml

Das Volumen wird mit aqua dest. auf 5 ml aufgefüllt und die Lösung filtriert. Der pH-Wert beträgt um 8,0 und wird nicht eingestellt.
Die Schnitte werden 15-45 Min. bei 37° C inkubiert und zunächst mit 1%igem $CaCl_2$ (dreimaliger Wechsel, insgesamt 10 Min.), dann mit 2%igem $CoCl_2$ (3 Min.) behandelt, in aqua dest. gewaschen (viermaliger Wechsel, insgesamt 1 Min.) und schließlich in 5%iges $(NH_4)_2S$ getaucht (2 Min.). Nach gründlichem Spülen mit

fließendem Wasser werden sie ebenfalls durch Isopropanol und Xylol geführt und mit Entellan eingebettet.
Muskelfasern mit hoher ATPase-Aktivität sind gekennzeichnet durch einen braun-schwarzen Niederschlag von Kobaltsulfid.
Die Dokumentation von C. III und IV erfolgt ebenfalls auf High Speed Ektachrom Day Light Film unter Verwendung eines Blaufilters.

D. Substanzen

Fluoresceinisothiocyanat wird von Sylvana Co. Millburn, N.J. bezogen, Nitro Blue Tetrazolium von Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. Die Adenosin-5'-triphosphorsäure (Dinatriumsalz) stellt die Firma Merck Darmstadt her und NADH (Dinatriumsalz, Reinheitsgrad II) verwenden wir von Boehringer & Sohn, Mannheim.

ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN

A. Antikörper gegen PAM, ihre Organ- und Artspezifität

Nach mehrfacher Injektion von PAM in der Gelform bilden Kaninchen Antikörper, die im Geldiffusionstest gegen das homologe Antigen PAM eine Präzipitationsbande bilden. Sie reagieren nicht mit dem kontraktilen Protein der glatten Uterusmuskulatur (UAM), und umgekehrt reagiert PAM nicht mit Antiseren, die gegen UAM erzeugt wurden (Abb. 1).

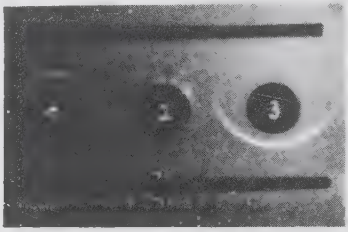

Abb. 1: Diffusion von PAM (1) und UAM (3) gegen anti-PAM (oberer Graben) und anti-UAM (unterer Graben).

Läßt man anti-PAM im Diffusionstest mit den Bausteinen des Aktomyosinmoleküls reagieren, so zeigt sich, daß das Antiserum neben PAM erwartungsgemäß auch PM und P-HMM präzipitiert, während es mit P-LMM Fr_1 und P-Aktin keine Fällungszone bildet (Abb. 2).

Aus weiteren Untersuchungen geht hervor, daß das Antiserum zwar organ-, nicht aber speziesspezifisch ist, denn es reagiert mit quergestreifter und Herzmuskulatur des Menschen, vom Kaninchen (Gesamtmuskulatur), von Ratten, Mäusen und Hühnern. Unspezifische Reaktionen (Leber, Milz, Hirn, lösliche Sarkoplasmaproteine, Plasma, Fibrin, Myokinase, Adenylsäure-Deaminase werden nicht gefunden (16). Isoliert man jedoch die kontraktilen Proteine getrennt aus rein "roten" und rein "weißen" Muskeln, so wird offenbar, daß anti-PAM nur mit den

kontraktilen Proteinen der "roten", nicht aber mit denen der "weißen" Muskeln reagiert, und die Aktomyosine aus "weißen" Kaninchenmuskeln reagieren nicht mit anti-PAM, wohl aber mit Antikörpern gegen "weißen" Hühnerbrustmuskel (Abb. 3).

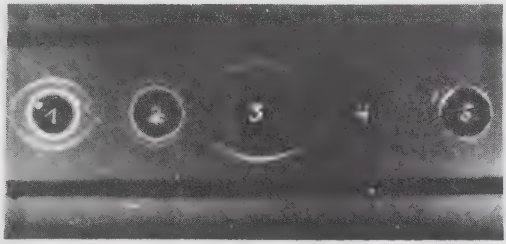

Abb. 2: Diffusion von PAM (1), PM (2), P-HMM (3), P-LMM Fr_1 (4) und P-Aktin (5) gegen anti-PAM (oberer und unterer Graben enthalten Antiseren von verschiedenen Kaninchen.)

Abb. 3: Diffusion von Aktomyosin aus roten (1) und weißen (2) Kaninchenmuskeln gegen anti-PAM (unterer Graben) und anti-Huhnpectoralisactomyosin (oberer Graben).

B. Ergebnisse der Untersuchungen an Gewebeschnitten

Für die nun beschriebenen Untersuchungen der Immunfluoreszenz (I), der Reduktase-Aktivität (II) und der ATPase-Aktivität (III) werden jeweils unmittelbar aufeinanderfolgende Gefrierschnitte verwendet, die einen direkten Vergleich der Färbemuster gestatten. Von den zahlreichen untersuchten Beispielen, die im Folgenden beschrieben werden, sind nur einige typische Vertreter abgebildet.

I. Darstellung der quergestreiften Muskelfasern nach Einwirkung von FITC-anti-PAM-γ-G

Bei Einwirkung von FITC-anti-PAM-γ-G auf quergestreifte Muskeln von Kaninchen und Mensch bestätigen sich die früheren Befunde über die Anfärbung der Muskelfasern mit verschiedener Intensität. Gemäß unseren Befunden teilen wir in drei verschiedene Gruppen ein:

Typ A: Muskelfasern mit nahezu gleichem Durchmesser und gleichmäßig starker Fluoreszenz. Dazu zählen der Herzmuskel und die Mm. triceps brachii (caput mediale), soleus und semitendinosus (siehe Abb. 4a).

Typ B: Dieser Typ umfaßt Muskeln mit Fasern starker, mittlerer und schwacher Fluoreszenz. Die Faserdurchmesser sind entweder wenig unterschiedlich (Mm. glutaeus minimus, tibialis anterior, vastus lateralis - siehe Abb. 5a -), oder es finden sich dünne, stark fluoreszierende Fasern neben dickeren Fasern mit mittlerer und schwacher Fluoreszenz (Mm. biceps brachii, iliacus, plantaris und Diaphragma - siehe Abb. 6a -).

Sowohl der M. pectoralis maior wie auch der M. rectus abdominis des Menschen weisen Fasern gleichen Durchmessers mit mittlerer und starker Fluoreszenz auf, schwach fluoreszierende Fasern werden nicht gefunden (siehe Abb. 7a).

Typ C: Hierzu gehören Muskeln, die vorwiegend aus dicken Fasern mit schwacher Fluoreszenz bestehen; gelegent-

lich finden sich sehr dünne, stark fluoreszierende Fasern (Mm. gastrocnemius (caput mediale), glutaeus medius, psoas maior und longissimus dorsi - siehe Abb. 8a -).

LEGENDE ZU DEN ABBILDUNGEN 4 - 8

Serienschnitte von Muskeln nach Reaktion
a. mit FITC-anti-PAM-γ-G
b. auf NADH-Diaphorase
c. auf Myosin ATPase

Abb. 4: M. semitendinosus (Kaninchen)
Abb. 5: M. vastus lateralis (Kaninchen)
Abb. 6: Diaphragma (Kaninchen)
Abb. 7: M. rectus abdominis (Mensch)
Abb. 8: M. longissimus dorsi (Kaninchen)

Abb. 4a

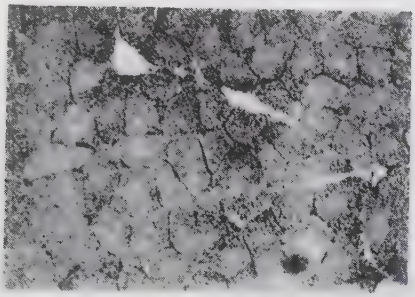

Abb. 4b

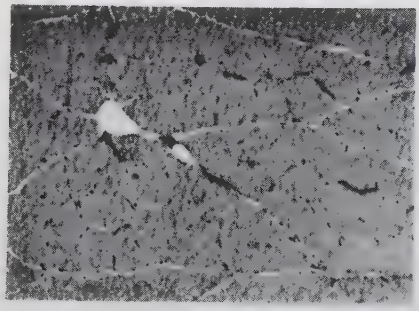

Abb. 4c

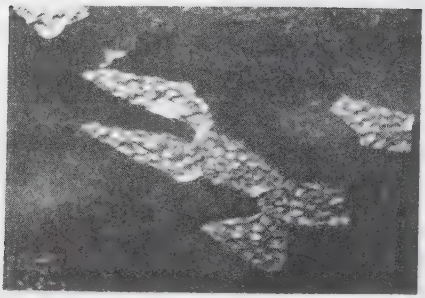

Abb. 5a

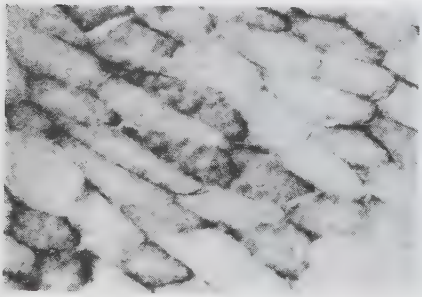

Abb. 5b

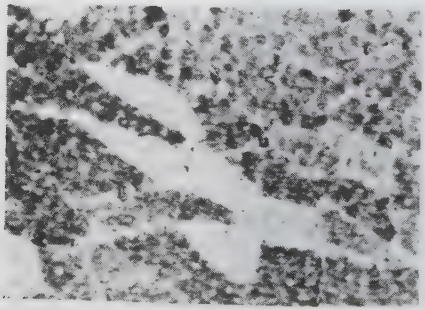

Abb. 5c

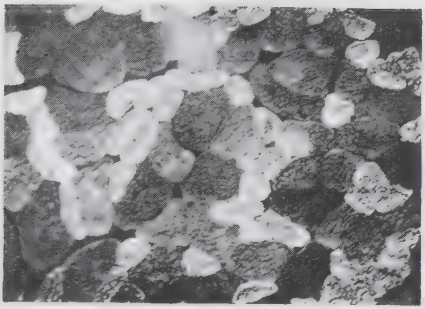

Abb. 6a

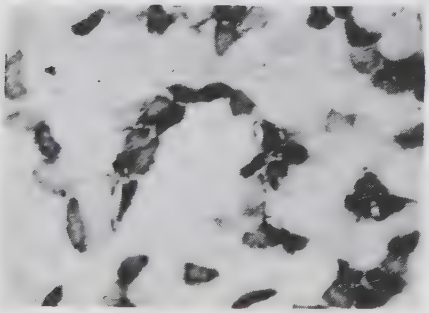

Abb. 6b

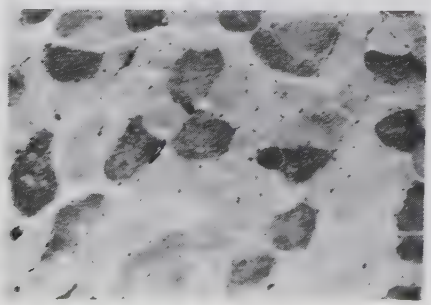

Abb. 6c

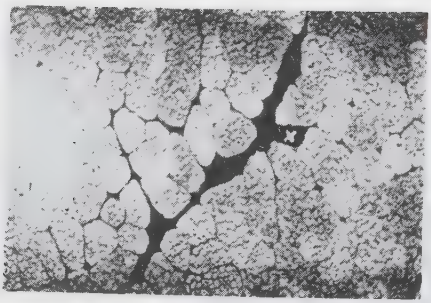

Abb. 7a

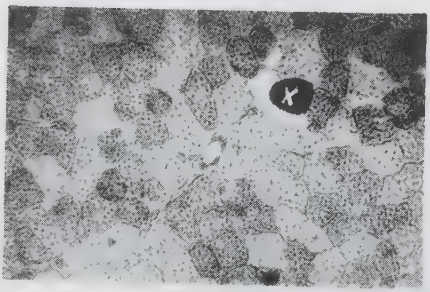

Abb. 7b

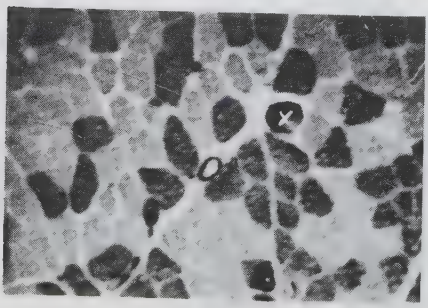

Abb. 7c

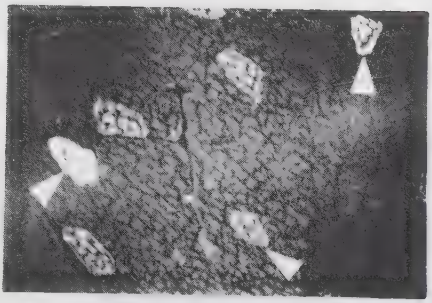

Abb. 8a

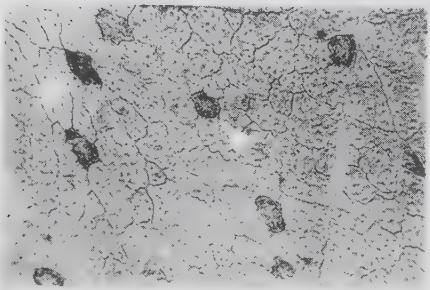

Abb. 8b

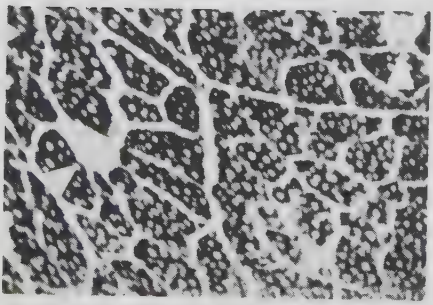

Abb. 8c

Bei ideal quergeschnittenen Muskeln ist deutlich zu erkennen, wie die Fluoreszenz in allen drei Fasertypen auf die Fibrille beschränkt ist (Abb. 9).

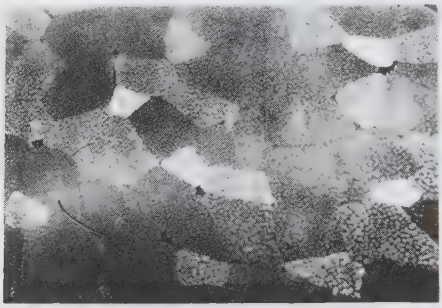

Abb. 9: M. plantaris (Kaninchen) nach Anfärbung mit FITC-anti-PAM-γ-G

Wird anti-PAM vor seiner Einwirkung auf das Gewebe 16 Stunden an Aktomyosingel (0,2 ml anti-PAM-γ-G) absorbiert, so bleibt erwartungsgemäß die Reaktion aus.

Ebenso unterbleibt die Fluoreszenz, wenn man auf die Gewebe FITC-anti-UAM-γ-G oder FITC-NIS-γ-G einwirken läßt.

II. Darstellung der Fasern aufgrund ihrer Reduktase-Aktivität am Beispiel der NADH-Diaphorase

Auch hier war eine Unterscheidung in drei Untergruppen möglich:

1. Fasern mit hoher Reduktase-Aktivität. Dazu gehören neben dem Herzmuskel die Mm. triceps brachii (caput mediale), soleus und semitendinosus (siehe Abb. 4b). Diese Gruppe entspricht somit den Typ A Muskeln (B. I) mit einheitlich starker Fluoreszenz.
2. In dieser Gruppe finden sich Muskeln mit Fasern hoher, mittlerer und keiner Aktivität. Bei hoher Reduktase-Aktivität ist das gebildete Formazan entsprechend der Anordnung der Mitochondrien (27) mehr oder weniger diffus über die Zelle verteilt. Diese Fasern entsprechen denjenigen mit intensiver Fluoreszenz (siehe Abb. 6b). Bei den Fasern mittlerer Aktivität befinden sich die Mitochondrien, und damit die Reduktaseorte, weniger im Zellinneren, sondern gehäuft an der Zellperipherie. Diesen Fasern entsprechen im allgemeinen solche mit mittlerer Fluoreszenz (siehe Abb. 5b). Fehlende Reduktase-Aktivität und schwache Fluoreszenz finden sich ebenfalls in einander entsprechenden Zellen (siehe Abb. 5b + 6b). Die beobachteten Reduktase-Aktivitäten entsprechen somit den Fluoreszenz-Intensitäten der Gruppe B. I. (S. 10)
3. Diese Gruppe entspricht dem Typ C: es überwiegen weitaus Fasern ohne Reduktase-Aktivität (schwache Fluoreszenz - siehe Abb. 8b).

In Analogie zur starken und mittleren Fluoreszenz der menschlichen Muskeln finden wir Fasern mit starker und mittlerer Reduktase-Aktivität (siehe Abb. 7b). Fasern ohne Reduktase-Aktivität, die in den "weißen" Tiermuskeln zu finden sind, fehlen hier.

III. Darstellung der Fasern aufgrund ihrer Myosin-ATPase-Aktivität

Die Muster verhalten sich im allgemeinen reziprok zu den Färbungen B. I und II. Fasern starker Fluoreszenz und hoher Reduktase-Aktivität zeichnen sich durch geringe ATPase-Aktivität aus, und Fasern mit schwacher Fluoreszenz und niedriger Reduktase-Aktivität sind durch hohe ATPase-Aktivität gekennzeichnet (siehe Abb. 4c-8c). Fasern mittlerer Fluoreszenz und Reduktase-Aktivität weisen nur in Einzelfällen auch mittlere ATPase-Aktivität auf (Mm. vastus lateralis, iliacus, Diaphragma - siehe Abb. 6c -). In den übrigen Fällen findet sich in den "Intermediärfasern" starke ATPase-Aktivität.

Bei den menschlichen Muskeln finden wir nur zwei Intensitäten: Fasern mit mittlerer und solche mit schwacher Intensität. Fasern mit hoher ATPase-Aktivität scheinen zu fehlen.

Diese Befunde werden an anderer Stelle diskutiert.

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

In jüngster Zeit werden in vermehrtem Ausmaß immunologische Methoden zur Lokalisation von Proteinen im Gewebsverband herangezogen. Voraussetzung dafür ist die Produktion von Antikörpern, die spezifisch gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet sind und die keine Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen geben. Das von uns gewonnene Kaninchen-Antiserum gegen gereinigtes Aktomyosin des menschlichen M. pectoralis maior erfüllt diese Bedingungen. Es ist spezifisch gegen das biologisch aktive H-Meromyosin der quergestreiften und Herzmuskulatur gerichtet, es zeigt keine Kreuzreaktion mit den kontraktilen Proteinen der glatten Muskulatur und keine unspezifischen Reaktionen. Diese Spezifität konnte gesichert werden durch Immundiffusion (Abb. 1 bis 3), durch die empfindliche Methode der Immunadhärenz (28) und durch spezifische Hemmung biologischer Aktivitäten, wie Aktinbindung, Synärese und ATPase-Aktivität (16).

Obgleich quantitative Messungen der Antigen-Antikörper-Reaktion noch ausstehen, können wir aussagen, daß das Antiserum keine Speziesunterscheidung zwischen Mensch, Kaninchen, Ratte und Huhn treffen kann, was die Gesamtmuskulatur anbetrifft. Sobald jedoch die Aktomyosine getrennt aus rein "roten" Muskeln (bestimmt aufgrund ihres hohen Gehaltes an mitochondrialen Enzymen, z.B. NADH-Diaphorase) und rein "weißen" Muskeln (bei denen keine Mitochondrienanhäufung zu beobachten ist) isoliert werden, trifft diese Aussage nicht mehr zu. Anti-PAM scheint bevorzugt gegen das Aktomyosin der "roten" Muskeln gerichtet zu sein, und dementsprechend reagiert das Antiserum gegen das Aktomyosin der "weißen" Hühnerbrustmuskulatur fast ausschließlich mit dem Aktomyosin "weißer" Muskeln (siehe Abb. 3). Dieses Ergebnis überrascht nicht, wenn man die immer zahlreicher erscheinenden Berichte der Biochemiker über isomere Formen des Myosins aus "roten" und "weißen" Muskelfasern in Betracht zieht. (10, 11, 12, 13, 14, 15). Zwar berichtet WU, daß sich keine nennenswerten Unterschiede in der Aminosäure-

zusammensetzung von "roten" und "weißen" Myosinen finden (wobei seine Differenzierung aufgrund eigener Versuche durchaus in Frage gestellt werden kann); es ist jedoch hinreichend bekannt, daß bereits der Austausch weniger Aminosäuren im Molekülverband zu antigener Differenzierung führen kann (29). Derartige geringe Unterschiede dürften bei einem vermutlichen Molekulargewicht der Myosinuntereinheit von 250 000 (etwa 2 000 Aminosäurereste) wohl kaum zu erfassen sein. Unsere Beobachtungen erinnern an Ergebnisse der immunchemischen Untersuchungen der Lactatdehydrogenase (30), bei der die beiden Extremformen I und V speziesunspezifisch mit den Formen I und V anderer Arten, jedoch nicht untereinander reagieren können. Noch ehe der Biochemiker sich mit Myosinisoenzymen auseinanderzusetzen begann, hat der Histochemiker bereits eine Einteilung der Muskeln in "weiß" (rasch reagierend, vorwiegend glykolytischer Stoffwechsel, hohe ATPase-Aktivität) und "rot" (tonischer Muskel, vorwiegend oxidativer Stoffwechsel, niedrige ATPase-Aktivität, dem Herzmuskel nahestehend) aufgrund spezifisch histochemischer Nachweise, nämlich der Reduktase- und der ATPase-Aktivität, getroffen (1, 2, 3, 4, 5, 6).
Eine intensive Untersuchung zahlreicher Muskelschnitte von Kaninchen und Mensch zeigte uns nun, daß in histochemisch als "rot" definierten Fasern eine weitaus intensivere Antigen-Antikörper-Reaktion auftrat (starke Fluoreszenz bei Einwirkung von FITC-anti-PAM-γ-G) als bei den "weißen" Fasern. Interessanterweise finden sich bei der Immunfluoreszenz Intermediärformen, die wiederum den Zwischenformen der NADH-Diaphorase entsprechen (siehe Abb. 6a + b). Da sich Myosin vermutlich aus zwei "identischen" Untereinheiten aufbaut (31), könnte die Intermediärform u.U. die Hybride zweier Extremformen darstellen.

Daß eine Unterscheidung der Intermediärformen aufgrund ihrer ATPase-Aktivität nur in vereinzelten Fällen zu treffen ist, mag an der mangelnden Spezifität der Methode liegen. Absolute Vergleiche aus den Farbintensitäten sind nicht möglich, da selbst bei Doppelversuchen, unter strenger Einhaltung identischer Versuchsbedingungen, keine gleichen Intensitäten erzielt werden konnten. In Übereinstimmung mit NYSTRÖM (32) finden wir auch

in den Kapillaren hohe Aktivität. Dieser Befund läßt uns vermuten, daß auch andere Phosphatasen an dieser Reaktion beteiligt sind und sie daher nicht spezifisch für myofibrilläre ATPase ist.

Wir können im Augenblick keine endgültigen Erklärungen dafür abgeben, warum die Antikörper gegen Aktomyosin aus menschlichem Pectoralis Muskel vorwiegend mit "roten" Muskelfasern reagieren. Nach PEARSE (persönliche Mitteilung) sind menschliche Muskeln gemischt, wobei weder der eine noch der andere Fasertyp überwiegt. OGATA (33), der drei Fasertypen unterscheidet, schränkt allerdings ein, daß beim Menschen in den mittleren und weißen Fasern die Aktivität der oxidativen Enzyme höher liegt und daher eine Unterscheidung in drei Typen nicht ohne weiteres getroffen werden kann. In den von uns untersuchten Mm. pectoralis maior und minor und rectus abdominis konnten wir bei mehreren Proben sowohl bei der Untersuchung auf oxidative Enzyme, wie auch in der Immunfluoreszenz im Vergleich zum Kaninchenmuskel mit Sicherheit nur zwei Fasertypen unterscheiden, nämlich solche mit mittlerer und starker Intensität. Gelegentlich ließen sich abgestufte Reaktionen beobachten, die jedoch die Abgrenzung eines weiteren Fasertyps nicht rechtfertigen. Rein "weiße" Fasern, wie z.B. in Abb. 8b, haben wir nie beobachtet. Unseren berichteten Ergebnissen stehen eine Vielzahl von Berichten über Heterogenität und Unspezifität von Myosin Antikörpern gegenüber (34, 35, 36, 37), die sich jedoch möglicherweise klären lassen, wenn man annimmt, daß Myosin tatsächlich in zwei immunologisch differenzierbaren Isomeren auftritt.
Wir können mit Sicherheit ausschließen, daß unsere Antikörper gegen partikuläre Verunreinigungen gebildet sind, da sich eine diskrete Lokalisierung der FITC-markierten Antikörper in den Fibrillen innerhalb der Faser feststellen läßt.
Nicht auszuschließen ist jedoch, daß die viel zitierten (38) niedermolekularen Verunreinigungen (LMP), die in "roten", "weißen" und Herzmuskeln von unterschiedlicher Struktur sein sollen (5), zur antigenen Spezifität beitragen (39). Diese von HORVÁTH in der Immundiffusion neben der Myosinbande beobachtete

Präzipitationsbande gegen LMP fanden wir jedoch in keinem unserer Antiseren.
Unabhängig davon, ob sich das LMP in weiteren Untersuchungen als schwer zu entfernende Verunreinigung oder als integrierter Bestandteil des H-Meromyosin-Moleküls erweist, können wir die von uns gewonnenen Antiseren zur Selektion und spezifischen Differenzierung "roter" und "weißer" Muskelfasern heranziehen.

ZUSAMMENFASSUNG

Antikörper, die in Kaninchen gegen Aktomyosin aus menschlichem Pectoralis Muskel gewonnen wurden, unterscheiden nach der Konjugation mit Fluoresceinisothiocyanat an Gewebeschnitten vom Tier drei und vom Mensch zwei verschiedene Fasertypen, gekennzeichnet durch starke, mittlere und schwache Fluoreszenz. Die dabei erhaltenen Muster sind deckungsgleich mit denjenigen, die durch Nachweis eines oxidativen Enzyms erhalten werden, und, mit einigen Ausnahmen, reziprok zu den Mustern, die wir bei Nachweis der ATPase-Aktivität finden.

Frau Privatdozentin Dr. Ute GRÖSCHEL-STEWART möchte ich für die Überlassung des Themas und ganz besonders für die mir stets erwiesene freundliche und großzügige Unterstützung bei der Abfassung dieser Arbeit meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Professor Dr. H. SCHWALM danke ich für die mir an seiner Klinik gebotene Arbeitsmöglichkeit.

Die Abbildungen wurden am ORTHOLUX Fluorescent-Mikroskop der Medizinischen Klinik aufgenommen, ich danke Herrn Professor Dr. E. WOLLHEIM für sein Entgegenkommen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für großzügige finanzielle Unterstützung der Forschungsaufgabe.

Herrn Prof. SCHIEBLER danke ich für wertvolle Anregungen und für die Übernahme des Korreferats.

LITERATURVERZEICHNIS

1. WACHSTEIN, M. and E. MEISEL: J. biophys. biochem. Cytol. 1, 483 (1955)

2. DUBOWITZ, V. and A.G.E. PEARSE: Nature 185, 701 (1960)

3. DUBOWITZ, V. and A.G.E. PEARSE: J. Path. Bact. 81, 365 (1961)

4. DUBOWITZ, V.: J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 28, 519 (1965)

5. LOCKER, R.H. and C.J. HAGYARD: Arch. Biochem. Biophys., 127, 370 (1968)

6. DREWS, G.A. and W.K. ENGEL: Nature, 212, 1551 (1966)

7. ENGEL, W.K.: unveröffentlichte Ergebnisse, zit.: Neurohistochemistry, Ed. C.W.M.ADAMS Elsevier Publ. Co. Amsterdam 1965, S. 622

8. OGATA, T.: Acta Med. Okayama 12, 216 (1958)

9. PADYKULA, H.A. and G.F. GAUTHIER: Anat. Res. 157, 296 (1967)

10. BÁRÁNY, M., K. BÁRÁNY, T. RECKARD and A. VOLPE: Arch. Biochem. Biophys. 109, 185 (1965)

11. SRETER, F.A., J. C. SEIDEL and J. GERGELY: J. Biol. Chem. 241, 5772 (1966)

12. TRAYER, I.P. and S.V. PERRY: Biochem. Z. 345, 87 (1966)

13. MADDOX, C.E.R. and S.V. PERRY: Biochem. J. 99, 89 (1966)

14. BÁRÁNY, M.: J. Gen. Physiol. 50, Nr. 6, Part 2, T97 (1967)

15. WU, C.S.C.: Biochem. 8, 39 (1969)

16. GRÖSCHEL-STEWART, U.: Habilitationsschrift Medizinische Fakultät der Universität Würzburg (1969)

17. GRÖSCHEL-STEWART, U. and D. DONIACH: Immunology 17, 6, 991 (1969)

18. GERGELY, J.A., MARTONOSI and M.A. GOUVEA: Sulfur in Proteins, S. 298, Academic Press N.Y. (1959)

19. PORTZEHL, H.: Z. Naturf. 66, 355 (1951)

20. CAMPBELL, D.H., J.S. GARVEY, N.E. CREMER and D.H. SUSSDORF: Methods in Immunology S. 118, W.A. Benjamin Inc. N.Y. 1964

21. NAIRN, R.C.: Fluorescent Protein Tracing, E.S. Livingstone Ltd., Edinburg and London, 1964

22. ROITT, I.M. and D. DONIACH: Immunology Techniques, Manual of World Health Council, Geneva, 1967

23. GOLDMANN, M.: Fluorescent Antibody Methods Academic Press N.Y. and London S. 125 (1968)

24. COONS, A.H.: Intern. Rev. Cytol. 5, 1 (1956)

25. BARKA, T. and P.J. ANDERSON: Histochemistry: Theorie, practice and bibliography Harper & Row, N.Y. 1963

26. PADYKULA, H.A. and E.J. HERMAN: Histochem. Cytochem. 3, 170 (1955)

27. OGATA, T. et al.: Acta Med. Okayama 21, 327 (1967)

28. GRÖSCHEL-STEWART, U. and J. GIGLI: Experientia 24, 65 (1968)

29. KABAT, E.A.: Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry HOLT, Rinehart and Winston, INC. N.Y. Chicago, 1968

30. RAJEWSKI, K., S. AVRAVEAS, P. GRABAR, G. PFLEIDERER and E.D. WACHSMUTH: Biochim. Biophys. Acta 92, 248 (1964)

31. LOWEY, S. and C. COHEN: J. Mol. Biol. 4, 293 (1962)

32. NYSTRÖM, B.: Acta neurol. Scand. 44, 405 (1968)

33. OGATA, T. and M. MORI: J. Histo. Cyto. 12, 171 (1964)

34. FINCK, H.: Biochim. Biophys. Acta 111, 208, 221, 231, 239 (1965)

35. EBERT, J.D.: in: The Cell, Vol. I, S. 619, Ed. J. Brachet and A.E. Mirsky, Academic Press, N.Y. 1959

36. FOX, A.C. and M.D. KLEIN: Biochim. Biophys. Acta 127, 232 (1966)

37. SAMUELS, A.: Arch. Biochim. Biophys. 92, 497 (1961)

38. BÂRÂNY, M.: Nature 213, 626 (1967)

39. HORVÂTH, B.Z. and S.A. SHAFIQ: Biochim. Biophys. Acta 194, 310 (1969)

LEBENSLAUF

Am 7. März 1941 wurde ich, Karla Maria Meschede, in Berlin als einzige Tochter des Buchdruckers Max Meschede und seiner Ehefrau Martha, geb. Gutowski geboren.
Meine Kindheit und Jugend verbrachte ich in Berlin. Nach vierjährigem Besuch der 22. Volksschule, Berlin-Lichtenberg und vierjährigem Besuch der Katholischen Liebfrauenschule in Berlin-Charlottenburg, wechselte ich 1955 in die Hermann-Hesse-Schule, mathematisch-naturwissenschaftliches und neusprachliches Gymnasium in Berlin-Kreuzberg, über, wo ich am 3.3.1960 das Abitur bestand.
Im Wintersemester 1960/61 immatrikulierte ich mich an der FU Berlin. Mit Beginn des Sommersemesters 1964 wechselte ich an die Universität Würzburg und bestand am 1.8.1969 das medizinische Staatsexamen.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe.

Ich versichere weiter ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Karla Maria Meschede

Offset-Druck Gugel, Würzburg
Marcusstraße 10

Offset-Druck Gugel, Würzburg
Marcusstraße 10